

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**(19)【発行国】**

日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUING COUNTRY]

Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報 (A)

(12)[GAZETTE CATEGORY]

Laid-open Kokai Patent (A)

(11)【公開番号】

特開平 7-278013

(11)[KOKAI NUMBER]

Unexamined Japanese Patent Heisei 7-278013

(43)【公開日】

平成7年(1995)10月24日

(43)[DATE OF FIRST PUBLICATION]

October 24, Heisei 7 (1995. 10.24)

(54)【発明の名称】

エンドトキシン中和剤

(54)[TITLE OF THE INVENTION]

Endotoxin neutralizer

(51)【国際特許分類第6版】

A61K 38/17 ADZ

38/00 ADD

AED

(51)[IPC INT. CL. 6]

A61K 38/17 ADZ

38/00 ADD

AED

【FI】

A61K 37/16 ADZ

37/18 ADD

AED

【FI】

A61K 37/16 ADZ

37/18 ADD

AED

【審査請求】 未請求**[REQUEST FOR EXAMINATION]** No**【請求項の数】** 3**[NUMBER OF CLAIMS]** 3**【出願形態】** FD**[FORM OF APPLICATION]** Electronic**【全頁数】** 8**[NUMBER OF PAGES]** 8

(21)【出願番号】

特願平 6-85660

(21)[APPLICATION NUMBER]

Japanese Patent Application Heisei 6-85660

(22)【出願日】

平成6年(1994)3月31日

(22)[DATE OF FILING]

March 31, Heisei 6 (1994. 3.31)

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

000006699

[ID CODE]

000006699

【氏名又は名称】

雪印乳業株式会社

[NAME OR APPELLATION]

Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

【住所又は居所】

北海道札幌市東区苗穂町6丁目
1番1号

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

川崎 功博

[NAME OR APPELLATION]

Kawasaki, Isahiro

【住所又は居所】

埼玉県川越市笠幡4481—21

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

門岡 幸男

[NAME OR APPELLATION]

Kadooka, Yukio

【住所又は居所】

埼玉県狭山市狭山台 4—29—
25ヒカリハイムA

[ADDRESS OR DOMICILE]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

堂迫 俊一

Dosemari, Shunichi

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

埼玉県浦和市北浦和 5—15—
39—616

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】

[NAME OR APPELLATION]

大谷 元

Otani, Hajime

【住所又は居所】

[ADDRESS OR DOMICILE]

長野県上伊那郡南箕輪村 830
6—1381

(57)【要約】

(57)[ABSTRACT OF THE DISCLOSURE]

【目的】

[PURPOSE]

乳由来のGMPを含む画分を
有効成分とするエンドトキシン中
和剤の提供。

Provision of the endotoxin neutralizer which
uses the fraction containing GMP derived from
milk as an active ingredient.

【構成】

[CONSTITUTION]

乳蛋白質の構成成分であるκ
—カゼインを酵素処理して得られ
るκ—カゼイングリコマクロペプチ
ド(GMP)または、その構造を含
む蛋白質あるいは蛋白質の加水
分解物をエンドトキシン中和剤と
して使用する。

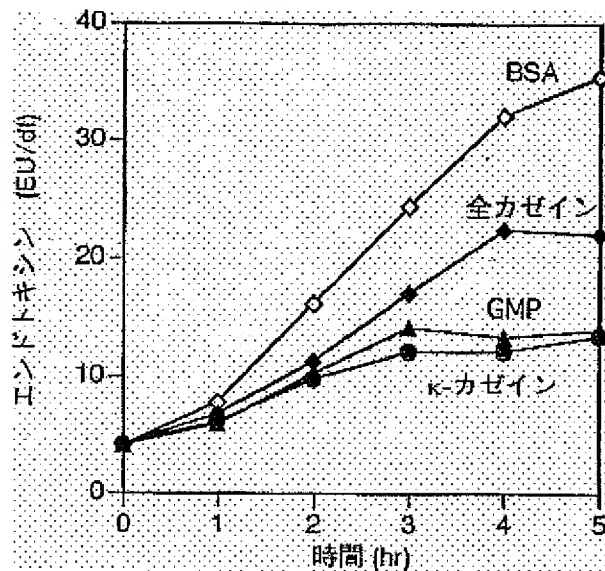
It uses the hydrolyzate of the (kappa)- casein
glyco macro peptide (GMP) obtained by treating
with enzyme (kappa)- casein which is the
structural component of a milk protein, a protein
including the structure, or a protein as an
endotoxin neutralizer.

【効果】

[ADVANTAGE]

エンドトキシンの血液中への移行を抑制するとともに、エンドトキシン作用を中和する。

It neutralizes an endotoxin effect, while controlling the transfer of an endotoxin through which it passes in blood.



エンドトキシン: Endotoxin

時間: Time

全カゼイン: All casein

κカゼイン: (kappa) casein

【特許請求の範囲】

[CLAIMS]

【請求項1】

カゼインまたはカゼインの酵素分解物を有効成分とするエンドトキシン中和剤。

[CLAIM 1]

The endotoxin neutralizer which contains the enzymatic degraded substance of casein or casein as an active ingredient.

【請求項2】

カゼインがκ-カゼインである請求項1記載のエンドトキシン中和剤。

[CLAIM 2]

The endotoxin neutralizer of Claim 1 whose casein is (kappa)-casein.

【請求項3】

カゼインの酵素分解物がκ-カ

[CLAIM 3]

The endotoxin neutralizer of Claim 1 whose

ゼイングリコマクロペプチドである請求項1記載のエンドトキシン中和剤。

enzymatic degraded substance of casein is a (kappa)- casein glyco macro peptide.

【発明の詳細な説明】

[DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

【0001】

[0001]

【産業上の利用分野】

[INDUSTRIAL APPLICATION]

本発明は、カゼインまたはカゼインの酵素分解物あるいは κ -カゼインを有効成分とするエンドトキシン中和剤に関し、さらにくわしくはカゼインより分離した κ -カゼインを酵素分解することにより調製することのできる κ -カゼイングリコマクロペプチド(以下GMPと称する)を有効成分とするエンドトキシン中和剤に関する。

This invention relates to the endotoxin neutralizer which uses the enzymatic degraded substance of casein or casein, or (kappa)-casein as an active ingredient, furthermore, it is related with the endotoxin neutralizer which uses as an active ingredient the (kappa)-casein glyco macro peptide (it calls Following GMP) which can be prepared by carrying out the enzymatic decomposition of the (kappa)-casein separated from casein in detail.

【0002】

[0002]

【従来技術】

[PRIOR ART]

エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞壁の構成成分であり、細菌の破壊によって放出される。そのエンドトキシン分子は、主として糖と脂肪酸から構成されており、7個程度の長鎖脂肪酸がアミドまたはエステルとして結合しているリン酸化D-グルコサミン2糖類から成るリピドAが、エンドトキシンの毒性を発揮する部位であることが知られている。抗生物質の使用などによって腸内で破壊された細菌から

An endotoxin is the structural component of the cell wall of gram negative bacteria.

Bacterial destruction discharges.

The endotoxin molecule mainly comprises saccharide and fatty acid, it is known that the lipid A which constitutes of the phosphorylation D-glucosamine disaccharide which about seven long chain fatty acids have connected as an amido or ester is the part which demonstrates the toxicity of an endotoxin.

By healthy people, it is thought to the endotoxin which it produces from the bacteria destroyed

生じるエンドトキシンに対して、健康者では腸から血中へ移行したエンドトキシンを肝臓で不活化しているものと考えられている。しかし、炎症性腸炎疾患や、サイクロスポリンなどの使用による免疫制御療法下における微小循環の障害、また腹膜炎などグラム陰性菌感染症に由来する敗血病巣から、エンドトキシンが血中に大量に移行する場合がある。このような場合、しばしばエンドトキシン血症を引き起こし、患者を死に至らしめることにも成りかねない。そのためエンドトキシンが血中へ大量に移行する可能性のある患者は、すべて血中エンドトキシン濃度を低下させるための治療を必要とする。

【0003】

血中のエンドトキシン濃度を低下させる処置として、腸管からのエンドトキシンの流入を軽減させる方法がある。これまで実際、ポリミキシン複合体(特開平3-220198)や脂肪族アミン(特開平5-271065)によりエンドトキシンを中和する方法や、エンドトキシンを吸収することができる物質を経口投与することにより、腸管から血中へのエンドトキシンの流入を減少させる方法(B. Ditter et al., Gastroenterology, Vol.84, 1547, 1983)について報告されている。またリポD部分を認識するモノクローナル抗体を敗血症の治

by use of antibiotics etc. within intestines that it is inactivating the endotoxin which moved into blood from intestines by the liver.

However, a large quantities endotoxin may move into blood from the septic lesion originating in gram-negative-bacteria infectious disease, such as inflammatory enteritis illness, and a failure of the microcirculation under the immunity control treatment by use of cyclosporin etc., peritonitis.

In such a case, it often causes an endotoxin blood disease and may constitute also to making a patient die.

Therefore, all the patients to whom an endotoxin may move in large quantities into blood need the treatment for reducing a blood endotoxin level.

【0003】

As provision to which it reduces a blood endotoxin level, there is a method of alleviating inflow of the endotoxin from an intestinal tract.

The method to neutralize an endotoxin by the polymyxin composite body (Unexamined-Japanese-Patent No. 3-220198) or a fatty amine (Unexamined-Japanese-Patent No. 5-271065) and the method (B.Ditter et al., Gastroenterology, Vol.84, 1547, 1983) of decreasing inflow of the endotoxin from an intestinal tract to into blood by orally administering the matter which can absorb an endotoxin are actually reported until now.

Moreover, there is also a report of using the monoclonal antibody which recognizes the lipid A part for the treatment of the sepsis.

療に使用することに関する報告もある。(E. J. Ziegler et al., New England J. Med., 1991, 429)しかし、エンドトキシンを腸内で中和する必要のある患者では、多くの場合その中和剤をある程度長期間、例えば腸内の炎症が治まるまで、投与する必要がある。このことを考慮すれば、前述した様な合成薬剤は、副作用の危険性を常に内在しており長期投与は必ずしも適当ではない。一方、中和抗体は一般に高価であり、現実的な治療法とするにはコストの問題を解決しなければならないし、経口投与によって効果を発揮させるためには消化管内での失活や分解の問題を解決する必要がある。また天然物由来のエンドトキシン中和剤としてカブトガニ由来のペプチド(特開平4-82840)が知られている。しかし、このペプチドを大量に供給することは原料となるカブトガニが大量に供給できないことや簡単に精製することが困難であるなどの理由から実用的とは言えない。また特表平5-501416号公報には鉄結合型ラクトフェリンIgGの併用によってエンドトキシンの毒性作用の予防と治療を行う方法が開示されている。これはラクトフェリンの静菌作用によるものである。

(E. J. Ziegler et al., New England J. Med., 1991, 429)

However, somewhat for a long period, it is necessary to administer the neutralizer in a patient with the need of neutralizing an endotoxin within intestines, in many cases, until the inflammation for example, in intestines is subsided.

If this is considered, synthetic chemicals which were mentioned above are always inherent in the danger of a side reaction, and a long-term administration is not necessarily suitable.

On the other hand, generally a neutralizing antibody is expensiveness.

It must solve the problem of cost, in order to consider it as a realistic cure, and in order to demonstrate an effect by oral administration, it is necessary to solve a deactivation within a digestive tract, and the problem of a degradation.

Moreover, the peptide (Unexamined-Japanese-Patent No. 4-82840) derived from a horseshoe crab is known as an endotoxin neutralizer derived from a natural product.

However, it cannot say that it is practical to supply this peptide in large quantities due to the reasons that the horseshoe crab used as a raw material cannot be supplied in large quantities, and it is difficult to purify easily.

Moreover, the method combined use of the iron knot-pattern lactoferrin IgG performs prevention and the treatment of the toxic effect of an endotoxin is disclosed by Patent Publication 5-501416.

This is based on the bacteriostatic effect of the

lactoferrin.

[0004]

一方、本発明者らはこれまでに乳、特に牛乳の蛋白質に関して研究を行う過程で、牛乳中の主要成分である蛋白質画分に種々の生理作用が存在することを見出している。特に牛乳の主要な蛋白質であるカゼインには、ヒト正常Bリンパ球増殖促進作用(特開平1—19022号公報)、コレラトキシンなどのエンテロトキシンの中和作用(特開平2—207089号公報)、細胞表面への病原菌付着阻止作用(特開平3—220130号公報)などが存在することを確認している。これらの作用に関与するものは、乳蛋白質中の構造に存在する κ カゼイングリコマクロペプチド構造に由来している。このGMPは、カゼインを構成する蛋白質である κ カゼインのN末端アミノ酸から106番目のメチオニンで切断されたアミノ酸残基数63個、4本の糖鎖結合、1ヶ所のリン酸化部位を有する糖ペプチドである(W.N.Eigel et al., J.Dairy Sci, Vol.67, 1599-1631, 1984, および朝倉書店刊、山内邦男他編集、ミルク総合事典、517頁)。本発明者らが、このGMPについて研究を行ったところ、従来全く知られていないエンドトキシンの活性を中和し、さらに腸管内で発生したエンドトキシンの血管内への移

[0004]

It is discovering that various physiological function exists in the protein fraction which the present inventors is the process in which it does research about the protein of milk, especially cow's milk until now, and is a basic component in cow's milk on the other hand.

To casein which is the main proteins of particularly cow's milk, it is checking that the counteraction (Unexamined-Japanese-Patent No. 2-207089 gazette) of enterotoxin, such as a human normal B-lymphocyte growth promotion effect (Unexamined-Japanese-Patent No. 1-19022 gazette) and a cholera toxin, the pathogenic-microbe adhesion blocking effect (Unexamined-Japanese-Patent No. 3-220130 gazette) to the cell surface, etc. exist.

What participates in these effects originates in the casein (kappa) glyco macro peptide structure which exists in the structure in a milk protein.

This GMP is a glycopeptide which has at least 63 sugar-chain connections of the number of amino acid residues, and 4 cut from N terminal amino acid of casein which is the protein which comprises casein (kappa) by the 106th methionine, and one phosphorylation part (W. N.Eigel et al., J.Dairy Sci, Vol. 67, 1599- edit besides 1631, 1984, and Milk Synthesis Encyclopedia, 517 pages, published by Asakura Shoten, written by Yamauchi, Kunio).

When the present inventors does research about this GMP, it neutralizes the activity of the endotoxin which formerly is not known at all,

行を抑制する強い作用を有することを見出した。さらにこの作用は、GMPの構造を含むような蛋白質すなわち、 κ -カゼインやカゼイン中にも存在することを初めて確認した。エンドトキシンは、上述したコレラトキシンなどのエンテロトキシンとは全く異なる毒素である。エンテロトキシンは分子量約84kDaの蛋白質であり、腸管上皮細胞に作用して細胞内のサイクリックAMP濃度を上昇させることで、細胞内から水分を遊離させて下痢を引き起こすという作用機構が知られている。一方エンドトキシンは上述のように、糖と脂肪酸から構成されており、その生理作用も発熱、白血球や血小板の減少、骨髓出血壊死など多様な作用が知られており、全く異なる毒素である。このような異なった毒素の中和活性を同一物質が有することは全く新しい知見である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の研究結果に基づいて成されたもので、GMPまたはGMPの構造を含むような蛋白質あるいはその酵素加水分解物

furthermore, it discovered having the strong effect which controls transfer into the blood vessel of the endotoxin generated within the intestinal tract.

Furthermore, it checked that this effect existed also in a protein, i.e., (κ)-casein and casein, which includes the structure of GMP for the first time.

Enterotoxin, such as a cholera toxin which the endotoxin mentioned above, is completely different toxin.

The enterotoxin is the protein of molecular-weight approximately 84kDa.

The effect mechanism in which separate a water component from the inside of the cell, and it causes a diarrhea by acting on intestinal-tract epitheliocyte and raising intracellular cyclic-AMP concentration is known.

On the other hand, the endotoxin comprises saccharide and fatty acid as mentioned above, as for the physiological function, various effects, such as heat generation, a reduction of leukocyte or blood platelets, and bone-marrow bleeding necrosis, are known, it is completely different toxin.

It is completely new findings that the same matter has the neutralization activity of such different toxin.

【0005】

【PROBLEM TO BE SOLVED BY THE INVENTION】

Based on the above-mentioned research findings, it accomplished this invention, and it makes it a problem to provide the endotoxin

を有効成分とするエンドトキシン中和剤を提供することを課題とする。

neutralizer which uses as an active ingredient a protein which includes the structure of GMP or GMP, or its enzymatic hydrolyzate.

[0006]**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、GMPの生理活性について検討を行ったところ、上記したようにエンドトキシン活性の中和作用を初めて見出した。本発明は図1に示すような構造を有しているGMPまたは、GMPの構造を含むような蛋白質、あるいはこの蛋白質の酵素分解物を有効成分とするエンドトキシン中和剤にある。GMPは、哺乳動物種ごとにそれぞれ変異体が存在するが、本発明はそのような変異体をも包含するものである。また必要に応じ、あるいはGMPの調製方法によって、ペプチドのN末端やC末端側に欠失が生じたものも存在するが、本発明はそのような欠失体も包含する。

[0006]**[MEANS TO SOLVE THE PROBLEM]**

When the present inventors performed examination about the biological activity of GMP, he discovered the counteraction of endotoxin activity for the first time as above-mentioned.

This invention is in a protein which includes the structure of GMP or GMP which has the structure as shown in FIG. 1, or the endotoxin neutralizer which uses the enzymatic degraded substance of this protein as an active ingredient.

As for GMP, the variant each exists for every mammal kind.

However, this invention also includes such variant.

Moreover, a peptide with deletion generated at the N terminal or C terminal side in accordance with the requirement or the preparation method of GMP, exists.

However, this invention also includes such the deletion body.

[0007]

GMPはチーズの製造過程で生成する κ -カゼインのC末端側が酵素的に切断されて、生成する。カゼインは、牛乳蛋白質の主成分であり牛乳中の各カゼイン含量は、 α_{s1} -カゼインが12mg/m

[0007]

The C-terminal side of the (κ)-casein which forms GMP in the manufacture process of a cheese is cut enzymatically, it forms.

Casein is the principal component of a cow's milk protein, and casein content in cow's milk is (α) s_1 -casein 12 mg/ml, (β)-casein 8

1、 β -カゼインが8mg/ml、 κ -カゼインが4mg/ml (H. Mulder and P. Walstra, "The milk fat globule", Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Poly, England, p.21, 1974).

Since the structure of GMP which it uses as an endotoxin neutralizer is included in casein, it can use the casein separated from milk as an endotoxin neutralizer of direct this invention.

Furthermore, it treats with enzyme these, furthermore, it can also obtain as an active high fraction.

Or it can also consider it as the composition which contains GMP in high purity.

What limitation in particular does not have acid casein, a sodium caseinate, a calcium caseinate, etc., and is generally marketed as a foodstuff material can be used for casein.

When the ingestion of the casein is carried out, receiving a degradation with various digestive enzymes is anticipated.

However, from the enzymatic degraded substance of all casein having endotoxin neutralization activity as shown in the following Examples, also when it administers orally, the function of GMP which is an active center is maintained, after administration, it is anticipated that it is set to GMP and acts within a digestive tract.

の機能は保持され、投与後、消化管内でGMPとなり作用するものと予想される。

【0008】

また、カゼインを患者の病態食に配合して摂取させる場合には、消化性を考慮してあらかじめ酵素で

【0008】

Moreover, when letting disease-state foods of a patient mix and ingest casein, it can consider digestibility and can also hydrolyze with an

加水分解しておくこともできる。ここで使用する酵素については特に限定は無く、例えばペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、キモシンなどが例示される。この処理によって生成したGMPが効果を発揮する。

[0009]

この酵素処理の条件についても、特に限定は無い。各カゼインのなかで最もエンドトキシン中和活性の高かった κ -カゼインの調製方法としては、全カゼインを脱イオン水または特定の緩衝液に溶解した溶液をゲル濾過または限外濾過することにより分離する方法(特開昭59-91848)が本発明者らによって開示されており、この方法を採用することにより容易に回収することができる。またその他の蛋白質の分離方法を採用することもできる。このように分離した、 κ -カゼインは強いエンドトキシン中和作用を有し、この κ -カゼインの酵素分解物もまた、エンドトキシンに対して中和活性を有している。この κ -カゼインを蛋白質分解酵素処理に付し、この酵素分解物を調製することができる。また、この分解物からゲル濾過処理や吸着処理によってGMPを高濃度に濃縮することができる。さらにチーズ製造時チーズホエー中に遊離してくるGMPを、チーズホエーなどを原料として大量

enzyme beforehand.

There is no limitation in particular about the enzyme which it uses here, for example, a pepsin, the trypsin, the chymotrypsin, the papain, the chymosin, etc. are shown.

GMP formed by this treatment demonstrates an effect.

[0009]

There is no limitation in particular also about the conditions of this enzyme treatment.

The method (Unexamined-Japanese-Patent No. 59-91848) of separating the solution which dissolved all casein in a deionized water or specific buffer a gel filtration or by carrying out an ultrafiltration in each casein as a preparation method of the (κ)-casein which was the highest as for endotoxin neutralization activity is disclosed by the present inventors, it is easily recoverable by adopting this method.

Moreover, the separation method of another protein is also employable.

Thus, the separated (κ)-casein has a strong endotoxin counteraction, the enzymatic degraded substance of this (κ)-casein also has the neutralization activity to the endotoxin.

It attaches this (κ)-casein to proteolytic-enzyme treatment, it can prepare this enzymatic degraded substance.

Moreover, it can concentrate GMP in high concentration by gel-filtration treatment or an adsorption treatment from this decomposition product.

Furthermore, it can also prepare GMP which extricates in cheese whey at the time of cheese manufacture for cheese whey etc. in large

に調製することもできる。チーズホエー中から回収する方法は、特開昭63-284199、特開平2-276542、特開平3-294299、特開平4-198198、特開平4-330100に開示されており、これらの方法を採用することによって、効率良くしかも安価に回収することができる。こうして得られたカゼインや κ -カゼインあるいはそれらの酵素分解物、GMPなどは、GMP換算で10mg~30g/日程度を投与することで、エンドトキシンを中和し、エンドトキシンショックなどの発生を抑制することができる。

[0010]

GMPは必要に応じて、薬理的に許容される塩とすることができるが、具体的にはアルカリ金属、アルカリ土類、有機酸塩、無機酸塩などをあげることができるし、さらにカゼイン、 κ -カゼインまたはその分解物も同様である。GMPは注射または経口的によって投与することも可能であるし、カゼイン、 κ -カゼインまたはその分解物は経口的に投与することができる。投与のための製剤化においては通常、ペプチドや蛋白質を製剤化するために必要な、賦型剤、安定剤などを自由に選択して製剤とすることができる。カゼインは食品として広く摂取されており、安全性は全く問題がなく、さらにGM

quantities as a raw material.

The method of collecting out of cheese whey is disclosed by Unexamined-Japanese-Patent No. 63-284199, Unexamined-Japanese-Patent No. 2-276542, 3-294299, 4-198198, 4-330100, by adopting these method, it is efficiently and cheaply recoverable.

The casein obtained by carrying out like this, (kappa)- casein or those enzymatic degraded substances, and GMP etc., it is administering 10 mg - 30 g /day degree by GMP conversion, and neutralizes an endotoxin, it can control generating of the endotoxin shock etc.

[0010]

GMP can be made into a pharmacologically permissible salt as required.

However, it can mention an alkali metal, an alkaline earth, organic-acid salt, an inorganic acid salt, etc. specifically.

Furthermore, casein, (kappa)- casein, or its decomposition product is also similar.

It can also administer GMP with injection or an oral target, it can administer orally casein, (kappa)- casein, or its decomposition product.

It can choose freely the forming agent required in order to usually formulate a peptide and a protein in the formulating for an administration, a stabilizer, etc., and can consider it as a tablet. Casein is widely ingested as foodstuffs, safety is completely satisfactory.

Furthermore, the LD50 value of GMP by an oral and an intraperitoneal administration is 1000

Pも経口、腹腔内投与によるLD50値は1000mg/kg以上であり、まったく問題がない。またκ-カゼインやGMPには、前述した大腸菌エンテロトキシンなどに対する毒素中和効果(特開平2-207089)の他、病原性大腸菌の腸管細胞への付着を阻止する効果(特開平3-220130)や病原菌、ウイルスなどに対する感染防御効果(特開昭63-284133)も知られており、複合感染の患者の治療や、あるいはこれらの細菌の感染防止にも使用することができ、これらの疾患に対する治療剤としての相乗効果も同時に期待できる。以下に実施例を示し、本発明をさらに説明する。

mg/kg or more.

It is completely satisfactory.

Moreover, the effect (Unexamined-Japanese-Patent No. 3-220130) which blocks adhesion into the intestinal-tract cell of enteropathogenic E. coli besides the toxin neutralization effect (Unexamined-Japanese-Patent No. 2-207089) with respect to Escherichia-coli enterotoxin etc. mentioned above, and a pathogenic microbe and the infection-protection effect (Unexamined-Japanese-Patent No. 63-284133) with respect to virus etc. are also known by (kappa)-casein and GMP, the treatment of the patient of a composite infection or it can use it also for infection prevention of these bacteria, and can also anticipate simultaneously the synergistic effect as a therapeutic agent with respect to these illness.

An Example is shown below, it demonstrates this invention further.

【0011】

【実施例 1】

本実施例においては、本発明の有効成分の一つでありGMPをその構造中に有するκ-カゼインの調製方法を示す。特開昭59-91848の方法を用いて牛乳よりκ-カゼインを調製した。市販のナトリウムカゼイネートを10%濃度になるように10mMのイミダゾール緩衝液(pH7.1)に溶解した。得られた溶液をセファデックスG100(ファルマシアLKB製)カラム

【0011】

【EXAMPLE 1】

In this Example, the preparation method of (kappa)-casein which is one of the active ingredients of this invention, and has GMP in the structure is shown.

It prepared (kappa)-casein from cow's milk using the method of Unexamined-Japanese-Patent No. 59-91848.

It dissolved the commercial sodium caseinate in 10 mM imidazole buffer (pH7.1) so that it might become 10 % concentration.

It attaches the obtained solution to SEPHADEX

に付し、さらにこの10mMのイミダゾール緩衝液を通液して溶出し、ポイドボリウムに溶出した画分を回収した。この画分を水に対して透析処理を行い、凍結乾燥を行って、 κ -カゼイン画分を得た。調製した κ -カゼインの電気泳動パターンからデンストメーターで純度を測定したところ、82%であった。

G100 (made by Pharmacia LKB) column, furthermore, it pours and elutes this 10 mM imidazole buffer, it collected the fractions eluted to the void volume.

It performed dialysis treatment for this fraction to water, it performed lyophilization, and obtained the (kappa)-casein fraction.

It was 82% when purity was measured with the densitometer from the prepared electrophoresis pattern of (kappa)-casein.

[0012]

【実施例 2】

本実施例においては、チーズ製造に伴って産生されるホエー蛋白質からGMPを調製する方法を示す。特開平2-276542の方法を用いてホエー蛋白質濃縮物(太陽化学製)からGMPを調製した。ホエー蛋白質濃縮物1kgを50℃の水50lに溶解し、濃塩酸によりpH3.5に調整した。これを、分画分子量20,000の限外濾過膜(DDS社GR61PP)を用いて60℃、圧力0.4MPa、平均透過液流速52.4l/m²・hで限外濾過を行った。透過液量が40lに達した時点で濃縮液に50℃の水40lを加えて連続で限外濾過処理を行い、160lの透過液を得た。この透過液に、25%水酸化ナトリウムを加えて、pH7.0とし、再度同じ条件で5lまで濃縮を行った。さらに、この液に水を加えて、同様の条件でダイアフィльтраーションを2回

[0012]

[EXAMPLE 2]

In this Example, the method to prepare GMP from the whey protein produced with cheese manufacture is shown.

It prepared GMP from the whey protein concentrate (made by TAIYO KAGAKU) using the method of Unexamined-Japanese-Patent No. 2-276542.

It dissolves 1kg of whey protein concentrates in 50l. of 50-degree C water, the concentrated hydrochloric acid adjusted at pH3.5.

It performed the ultrafiltration for this using the ultrafiltration membrane (DDS company GR61PP) of a molecular weight cut off 20,000 by 60 degrees C, the pressure of 0.4 Mpa, and the average passing through liquid 52.4l/m² *flow velocity h.

It added 40l. of 50-degree C water to the concentrate, when the passing through liquid quantity amounted to 40l., it was continuous and performed ultrafiltration treatment, and it obtained 160l. passing through liquid.

It adds the sodium hydroxide to this passing

繰り返した後、2lまで限外濾過濃縮し、凍結乾燥を行い、GMPを54g回収した。電気泳動による分析の結果、純度は90%であった。

through liquid 25%, and considers it as pH7.0, it performed concentration to 5l. on the same conditions again.

Furthermore, after adding water to this liquid and repeating diafiltration twice on similar conditions, it carries out ultrafiltration concentration to 2l., it performed lyophilization and collected 54g of GMP(s).

Purity was 90% as a result of the analysis by an electrophoresis.

[0013]**【実施例 3】**

本実施例においては、乳カゼインの酵素分解物の調製方法を示す。蛋白質分解酵素としてペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパン(いずれもシグマ社製)およびキモシン(ハンセン社製)を用い、ナトリウムカゼイネート(太陽化学製)を酵素分解処理した。カゼイン/酵素=100/1の比率で37°Cで1時間インキュベートし、インキュベート後ペプシン分解物は反応液を中性に戻し、その他は80°Cで5分間加熱することで反応を停止させた。生じた沈澱を遠心分離により除去し、上清を凍結乾燥することでカゼインの酵素分解物の粉末を得た。

[0013]**[EXAMPLE 3]**

In this Example, the preparation method of the enzymatic degraded substance of milk casein is shown.

It carried out enzymatic-decomposition treatment of the sodium caseinate (made by TAIYO KAGAKU), using a pepsin, the trypsin, the chymotrypsin, the papain (all being sigma company make), and the chymosin (made in Hansen) as a proteolytic enzyme.

Casein/enzyme = it incubates at 37 degrees C with 100/1 of ratios for 1 hour, an after-incubation pepsin decomposition product reconstructs a reaction mixture neutral, others stopped reaction by heating for 5 minutes at 80 degrees C.

A centrifugation removes the produced precipitation, it obtained the powder of the enzymatic degraded substance of casein by freeze-drying supernatant.

[0014]**[0014]**

【実施例 4】

本実施例においては、 κ -カゼインの酵素分解物の調製方法を示す。実施例1で調製した κ -カゼインを用い、実施例3と同様の方法で κ -カゼインの酵素分解物を調製した。

[EXAMPLE 4]

In this Example, the preparation method of the enzymatic degraded substance of (kappa)-casein is shown.

It prepared the enzymatic degraded substance of (kappa)-casein by the method similar to Example 3 using the (kappa)-casein prepared in Example 1.

【0015】**【実施例 5】**

本実施例においては、本発明治療剤の投与のための製剤処方例を示す。

(1) GMP200mg錠剤

GMP	200mg
コーンスターチ	40mg

ラクトース	98mg
-------	------

ステアリン酸マグネシウム	8mg
--------------	-----

タルク	4mg
-----	-----

g

常法により打錠機を用いて打錠する。

[0015]**[EXAMPLE 5]**

In this Example, the example of a qualitative and quantitative formula for an administration of this invention therapeutic agent is shown.

(1) GMP200 mg tablet

GMP	200 mg
Cornstarch	40 mg

Lactose	98 mg
---------	-------

Magnesium stearate	8 mg
--------------------	------

Talc	Four mg
------	---------

It tablets using a tablet machine by a conventional method.

【0016】**(2) GMP100mg注射用アンプル**

GMP	100mg
注射用蒸留水	2ml

滅菌後封入する。

[0016]**(2) Ampoule for GMP100 mg injection**

GMP	100 mg
Water for injection	2 ml

It seals after sterilization.

【0017】**(3) κ -カゼイン1000mgカプセル****[0017]****(3) (kappa)-casein 1000 mg capsule**

ル剤		(kappa)- casein	1000 mg
κ-カゼイン	1000	Lactose	50 mg
mg			
ラクトース	5		
0mg			
ステアリン酸マグネシウム	5	Magnesium stearate	5 mg
mg		After granulation by the conventional method, it	
常法により造粒後カプセルに充		filled in capsule and made capsule.	
填しカプセル剤とした。			

【0018】

(4) κ-カゼイン酵素分解物100
0mgカプセル剤

κ-カゼイン酵素分解物 1000
mg
ラクトース 5
0mg

【0018】

(4) 1000 mg capsule of (kappa)- casein
enzymatic degraded substances

(kappa)- casein enzymatic degraded substance
1000 mg
Lactose 50 mg

ステアリン酸マグネシウム	5	Magnesium stearate	5 mg
mg		After granulation by the conventional method, it	
常法により造粒後カプセルに充		filled in capsule and made capsule.	
填しカプセル剤とした。			

【0019】

【実施例 6】

本実施例は、細胞を用いた実験により本発明のエンドトキシン中和作用を示す。エンドトキシン中和活性は、リポポリサッカライド(LPS)によるマウス脾臓細胞の増殖に対するカゼインおよびその酵素分解物の抑制効果で評価した。マウス脾臓細胞は6週齢のC3H/HeN マウス(雄)から通常の

【0019】

【EXAMPLE 6】

This Example shows the endotoxin counteraction of this invention by experiment which used the cell.

Casein with respect to multiplication of the mouse spleen cell by a lipopolysaccharide (LPS) and the inhibitory effect of the enzymatic degraded substance evaluated endotoxin neutralization activity.

The mouse spleen cell is 6 week-old. It

方法で採取し、 3×10^6 細胞/mlの濃度で培地 (Celgrosser-P) 中に懸濁したものをアッセイに使用した。カゼイン、GMPまたはカゼイン酵素分解物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH7.2) に目的の濃度で溶解した。この溶液10mlに5mgのLPS (ディフコ社) を含むPBS10 μ lを加え、室温で1時間インキュベートした。インキュベート後、上述した脾臓細胞懸濁液100 μ lを加え5%CO₂ 雰囲気下37°Cで48時間培養した。脾臓細胞の増殖は、Mosmann (T. Mosmann, J. Immunol. Methods, 65, 55-63 (1983)) の方法に従いMTT法で評価した。25 μ g/ml \sim 100 μ g/mlにおける α _{s1}-カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインおよびGMPのLPS中和効果について図2に、全カゼインおよび κ -カゼインの酵素分解物のLPS中和効果を表1および表2に示した。

[0020]

全カゼインおよびその酵素分解物による細胞に対するLPS中和効果

阻害率(%)

collects by the usual method from a C3 H/HeN mouse (male), it used for the assay what was suspended in the medium (Celgrosser-P) by the 3×10^6 cell / concentration of ml.

It dissolved casein, GMP, or a casein enzymatic degraded substance in the phosphate buffered saline (PBS, pH7.2) by concentration of the objective.

It added PBS10 microliter which contains 5 mg LPS (Difco company) in 10 ml of this solution, and incubated at room temperature for 1 hour.

It added after incubation spleen cell suspension 100 microliter mentioned above, and cultivated 5% at 37 degrees C of CO₂ atmospheres for 48 hours.

According to the method of Mosmann (T.Mosmann, J.Immunol.Methods, 65,55-63 (1983)), MTT method evaluated multiplication of the spleen cell.

The LPS neutralization effect of the enzymatic degraded substance of all casein and (kappa)-casein was shown in Table 1 and 2 at FIG. 2 about (α)_{s1}-casein in 25 microgram(s)/ml - 100 microgram/ml, (beta)- casein, (kappa)-casein, and the LPS neutralization effect of GMP.

[0020]

All casein and the LPS neutralization effect with respect to the cell by the enzymatic degraded substance

Obstruction percentage (%)

酵素

Enzyme

濃度(μ g/ml)	全カゼイン	ペ	Concentration (microgram/ml)	All casein
プシン	トリプシン	キモ	pepsin	Tripsin
パパイン			Chymopapain	

トリプシン

Tripsin

25		10.6	25		10.6
7.3	8.9	7.9	7.3	8.9	7.9
7.4			7.4		
100		14.7	100		14.7
9.0	11.4	12.3	9.0	11.4	12.3
9.8			9.8		

阻害率は、マウス脾臓細胞にLPSを作用させた時の細胞増殖率を100%として算出した。

The inhibition rate computed the cell growth rate at the time of letting LPS act on the mouse spleen cell as 100%.

【0021】

【0021】

【表 2】

【TABLE 2】

κ-カゼインおよびその酵素

(kappa)- casein and the LPS neutralization

分解物による細胞に対するLPS effect with respect to the cell by the enzymatic
中和効果 degraded substance

阻害率(%) Obstruction percentage (%)

酵素 Enzyme

濃度(μ g/ml) κ - カゼイン Concentration (microgram/ml) (kappa)-
ペプシン トリプシン キモ Casein pepsin Tripsin Chymopapain
パパイン

Tripsin

トリプシン

25		17.6	25		17.6
11.1	12.7	14.5	11.1	12.7	14.5
10.9			10.9		
100		23.5	100		23.5
20.5	21.4	22.2	20.5	21.4	22.2
19.8			19.8		

阻害率は、マウス脾臓細胞にLP The inhibition rate computed the cell growth

Sを作用させた時の細胞増殖率を100%として算出した。

rate at the time of letting LPS act on the mouse spleen cell as 100%.

【0022】

図2および表1、2に示す様に、カゼイン、 κ -カゼイン、GMPおよびカゼインの酵素分解物は、100 μ g/mlの濃度でLPSによる脾臓細胞の増殖を9.0~31.4%抑制した。一方、対照として用いたウシ血清アルブミン(BSA)には抑制効果は全く見られなかった。この効果はカゼインおよびその酵素分解物に由来する特異な効果であると考えられた。

【0022】

As shown in FIG. 2 and Tables 1 and 2, it controlled multiplication of the spleen cell by LPS 9.0 to 31.4% by the enzymatic degraded substance of casein, (κ)-casein, GMP, and casein, and 100 microgram/ml concentration.

On the other hand, the inhibitory effect was not looked at at all by the bovine serum albumin (BSA) used as a control.

It was thought that this effect was casein and a unique effect originating in that enzymatic degraded substance.

【0023】

【実施例 7】

本実施例では、本発明のエンドトキシン中和作用を示す。エンドトキシンの毒性を確認するため、マウスにおけるリポポリサッカライド(LPS)の致死量を求めた。4週令雄の IRC-slc マウス(一群5匹)に20mg/mlのD-ガラクトサミン0.5mlを腹腔内に投与し、続いてLPS(ディフコ社製)を同じく腹腔内に投与した。投与後72時間のマウスの死亡率を表3に示した。

【0023】

【EXAMPLE 7】

This Example shows the endotoxin counteraction of this invention.

In order to check the toxicity of endotoxin, it calculated the lethal dose of the lipopolysaccharide (LPS) in a mouse.

4 weeks-old male It administers D-20 mg/ml galactosamine 0.5 ml to an IRC-slc mouse (five groups) at an intraperitoneal, then, similarly it administered LPS (made by a Difco company) to the intraperitoneal.

The mortality rate of the mouse of 72 hours was shown in Table 3 after administration.

【0024】

【表 3】

LPS投与によるマウスの死亡率

【0024】

【TABLE 3】

Mortality rate of the mouse by LPS

	administration	
投 与 量 (μ g)	Dosage	(microgram)
死亡率 (%)	Mortality rate (%)	
0.00	0.00	
0	0	
0.01	0.01	
40	40	
0.02	0.02	
80	80	
0.05	0.05	
100	100	
0.10	0.10	
100	100	
0.20	0.20	
100	100	

【0025】

LPSの致死量はマウス1匹当たり 0.05 μ g以上であることが判明した。一方、LPSを0.04 μ g/ml濃度となるようPBSに溶解し、これを各サンプル溶液と等量混合した。このサンプル溶液を37℃ 1時間インキュベートし、あらかじめ20mg/mlのD-ガラクトサミン0.5mlを腹腔内に投与したIRC-slc マウス(一群5匹)にサンプル溶液0.5mlを腹腔内に投与した。この時マウス一匹あたりに投

[0025]

It became clear that the lethal dose of LPS was 0.05 or more microgram per mouse. On the other hand, it dissolves LPS in PBS so that it may become 0.04 microgram(s)/ml concentration, it carried out equivalence mixing of this with each sample solution. It incubates 37 degrees C of this sample solution for 1 hour, it administered D-20 mg/ml galactosamine 0.5 ml to the intraperitoneal beforehand. It administered 0.5 ml of sample solutions to the IRC-slc mouse (five groups) at the intraperitoneal.

与した量LPSの量は、表 3 よりマウスを100%死に至らしめる量(0.05 μ g)の2倍量0.1 μ gを投与したことになる。LPS投与72時間後に本発明物質と混合してLPS活性を中和した場合とLPSのマウスの生存率を表4、5に示す。

The quantity of the quantity LPS administered to per mouse at this point administered amount of doubles 0.1 microgram of quantity (0.05 microgram) which makes a mouse die 100% from Table 3.

The viability rate of the mouse of the case where mixed with this invention matter 72 hours after the LPS administration, and LPS activity is neutralized, and LPS is shown in Tables 4 and 5.

【0026】

【0026】

【表 4】

全カゼインおよびその酵素分解物によるLPS中和効果

【TABLE 4】

All casein and the LPS neutralization effect by the enzymatic degraded substance

生存率(%) Viability-rate (%)

コントロール

Control

濃度(μ g) LPS(-) LPS(+) 全カ
ゼイン BSA

Concentration (microgram) (-) LPS LPS (+) All
casein BSA

25	100	0
40	0	
100	100	0
60	0	

25	100	0
40	0	
100	100	0
60	0	

生存率(%)				Viability-rate (%)			
カゼイン酵素分解物				Casein enzymatic degraded substance			
ペプシン リプシン	トリプシン パパイン	キモト キモシン		Pepsin Chymosin	trypsin	Chymotrypsin	papain
40		60		40	60		
60	40	60		60		40	60
60		80		60	80		
80	40	80		80		40	80

【0027】

【0027】

【表 5】

【TABLE 5】

κ -カゼインおよびその酵
素分解物によるLPS中和効果

(kappa)- casein and the LPS neutralization
effect by the enzymatic degraded substance

生存率(%)	Viability-rate (%)
--------	--------------------

コントロール			Control		
濃度(μ g) LPS(-) LPS(+) κ カゼイン			Concentration (microgram) (-) LPS LPS (+) (kappa) casein		
25	100	0	25	100	0
80			80		
100	100	0	100	100	0
100			100		
生存率(%)			Viability-rate (%)		
κ - カゼイン酵素分解物			(kappa)- Casein enzymatic degraded substance		
GMP ペプシン トリプシン キモトリプシン			GMP Pepsin trypsin Chymotrypsin papain		
パパイン キモシン			Chymosin		
100	60	60	100	60	60
60	60	80	60	60	80

100	60	80	100	60	80
80	60	80	80	60	80

【0028】

上記表4、5に示すように、カゼイン、 κ -カゼイン、GMP、およびそれらの酵素分解物はLPSによるマウスの死亡を顕著に抑制した。また、この効果は対照としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いた行った場合には認められなかった。カゼインおよびその酵素分解物に起因する特異な効果であると考えられた。

[0028]

Casein, (kappa)- casein, GMP(s), and those enzymatic degraded substances controlled death of the mouse by LPS notably as shown in the above-mentioned tables 4 and 5.

Moreover, this effect was observed when carried out using the bovine serum albumin (BSA) as a control.

It was thought that they were casein and a unique effect resulting from the enzymatic degraded substance.

【0029】**【実施例 7】**

本実施例は、経口投与による本発明の作用を確認した例を示す。サイクロスポリンなど免疫抑制剤は、腸管から血中へのエンドトキシンの通過を増加させることが知られている。(D. Nitsche et al., Langebecks Archiv fur Chirurgie, 1990) この動物実験系において、全カゼイン、 κ -カゼインおよびGMPが腸管から血中へのエンドトキシンの移行に対してどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。ウィスター系ラットをサイクロスポリン(12mg

[0029]**[EXAMPLE 7]**

This Example shows the example which checked the effect of this invention by oral administration.

It is known that immunosuppressive agents, such as cyclosporin, let passage of the endotoxin from an intestinal tract into blood increase.

(D. Nitsche et al., Langebecks Archiv fur Chirurgie, 1990)

In this animal experiment type, it performed examination about what kind of influence all casein, (kappa)- casein, and GMP do to transfer of the endotoxin from an intestinal tract into blood.

／kg／日)で4日間処理した。12時間絶食後、麻酔下開腹し、十二指腸にカテーテルを挿入した。カテーテルから大腸菌懸濁液(2.5×10^{10} CFU/kg)、続いてネオマイシン(16250 IU/kg)とパシトラシン(1250 IU/kg)を投与した。抗生物質の投与に続き、対照群(n=5)にはカテーテルを通じて2.5%アルブミン溶液(300 mg/kg)を、試験群には2.5%全カゼイン(300 mg/kg) (n=5)、2.5% κ -カゼイン(300 mg/kg) (n=5)および2.5%GMP(300 mg/kg) (n=5)を投与した。抗生物質投与後から1時間ごとに各ラットについて0.2 mlの血液検体を採取し、血清中のエンドトキシン濃度をトキシカラーシステム(生化学工業)で評価した。結果を図3に示した。全カゼイン投与群、 κ -カゼイン投与群およびGMP投与群ではアルブミン投与群(対照群)に比べ、抗生物質投与後1時間以降においてエンドトキシンの血中への移行の抑制が見られた。

【0030】

【発明の効果】

本発明の実施により、新規なエンドトキシン中和剤が提供される。このエンドトキシン中和剤は、経口投与で腸管内で発生したエンド

It treated the Wister rat for four days by cyclosporin (12-mg/kg /day).

It performs laparotomy under anesthesia after a 12-hour fast, it inserted the catheter in the duodenum.

It administered the Escherichia-coli suspension (2.5×10^{10} CFU/kg) from a catheter, subsequently neomycin (16250 IU/kg) and bacitracin (1250 IU/kg) continuously.

In the test group, it administered all casein (300 mg/kg) (n=5), 2.5%(kappa)- casein (300 mg/kg) (n=5), and 2.5% GMP (300 mg/kg) (n=5) for the albumin solution (300 mg/kg) 2.5% 2.5% through the catheter at the control group (n=5) following the administration of antibiotics.

It collects the 0.2 ml blood specimen about each rat for every hour after an antibiotics administration, the Toxy color system (Seikagaku) evaluated the endotoxin level in a blood serum.

The result was shown in FIG. 3.

By all casein administration groups, the (kappa)- casein administration group, and the GMP administration group, control of transfer into the blood of an endotoxin was seen compared with the albumin administration group (control group) after 1 hour after an antibiotics administration.

【0030】

【ADVANTAGE OF THE INVENTION】

A new endotoxin neutralizer is provided by implementation of this invention.

This endotoxin neutralizer controls transfer into the blood of an endotoxin generated within the

キシンの血中への移行を抑制し、エンドトキシン血症の発生を抑制することができる。その結果エンドトキシン血症を予防または治療することができる。

intestinal tract in oral administration, it can control generating of an endotoxin blood disease.

As a result, it can prevent or treat an endotoxin blood disease.

【図面の簡単な説明】

[BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS]

【図1】

GMPの一次構造を示す。

[FIG. 1]

The primary structure of GMP is shown.

【図2】

カゼインおよびGMPの細胞培養に及ぼすエンドトキシンの中和作用を示す。

[FIG. 2]

The counteraction of an endotoxin which it exerts on casein and the cell culture of GMP is shown.

【符号の説明】

- ◆ α_{s1} カゼイン
- ▼ β カゼイン
- κ -カゼイン

[DESCRIPTION OF SYMBOLS]

- <> (α)_{s1} casein
- REVERSE-BLACK-TRIANGLE (beta) casein
- BLACK-CIRCLE (κ)- casein

- ▲ GMP

- BSA

- BLACK-TRIANGLE GMP
- (SQUARE) BSA

【図3】

腸管から血中へのエンドトキシン移行に及ぼす κ -カゼインおよびGMPの作用を確認した結果を示す。

[FIG. 3]

The result of having checked the effect of the (κ)- casein which it exerts on the endotoxin transfer from an intestinal tract into blood, and GMP is shown.

【符号の説明】

- ◆ 全カゼイン投与群
- κ -カゼイン投与群
- ▲ GMP投与群

[DESCRIPTION OF SYMBOLS]

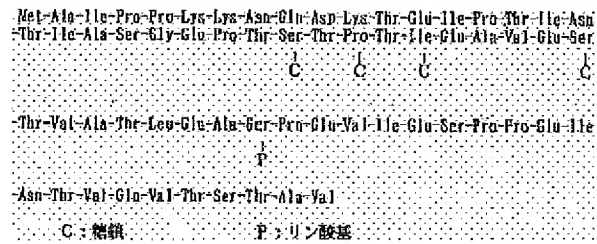
- <> All casein administration groups
- BLACK-CIRCLE (κ)- casein administration group

GMP

(SQUARE)

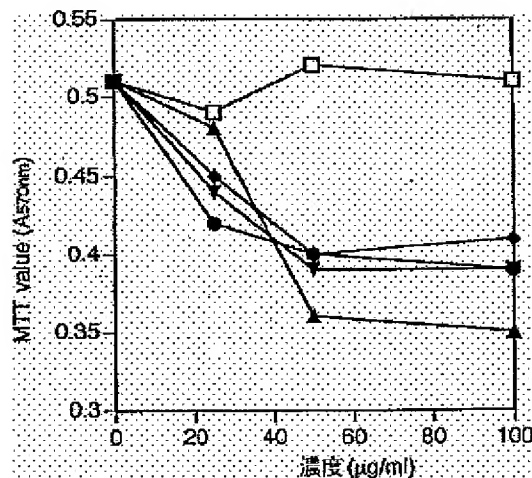
BSA administration group

[FIG. 1]



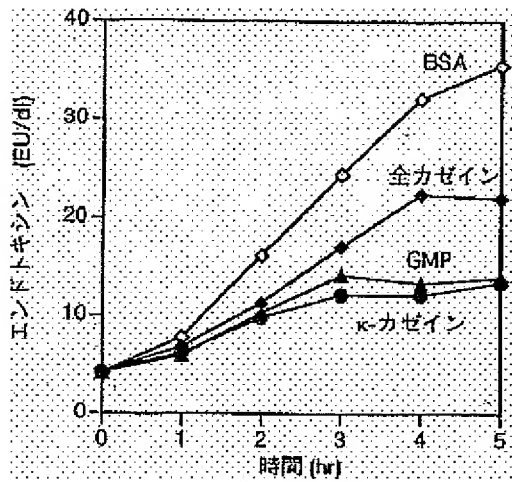
リン酸基: Phosphoric acid group

[FIG. 2]



濃度: Concentration

[FIG. 3]



エンドトキシン: Endotoxin

時間: Time

全カゼイン: All casein

カゼイン: Casein